京都工芸繊維大学

氏　　名	ふぁん かん にゅい ふん PHAM KHANH NGUYEN HUAN
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第 949 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　物質・材料化学専攻
学位論文題目	Study on bacteriophages for suppressing bacteria growth （バクテリアの増殖抑制のためのバクテリオファージの研究）
審査委員	(主査)教授　亀井加恵子 教授　堀内淳一 教授　鈴木秀之

論文内容の要旨

バクテリア感染症は抗生物質を用いた治療が一般的であるが、薬剤耐性菌の発生が治療を困難にしている。農業や畜産分野における抗菌物質の利用は、耐性菌の発生を増大させる。一方、新たな抗生物質の開発は困難であり、抗生物質の代替の開発が求められている。近年、バクテリアに特異的に感染し、溶菌するバクテリオファージ（ファージ）が新たな生物防除剤として注目されている。

本申請論文は、序論、第１章「ファージの単離とゲノム配列」、第２章「Escherichia ファージ KIT01、KIT02、KIT03 の宿主範囲、ゲノム比較および分類」、第３章「Escherichia ファージ KIT01、KIT02、KIT03 の抗菌特性の評価」から構成されている。

序論では、本研究の背景、目的が述べられている。まず、研究対象とした３種の菌について説明している。食中毒原因菌として知られる大腸菌（*Escherichia coli*)およびサルモネラ菌(*Salmonella enterica*)について概説し、さらに薬剤耐性菌の発生と世界保健機構(WHO)による新たな抗菌物質開発に関する提言について紹介している。また、ナス科植物の青枯れ病の原因菌である *Ralstonia solanacearum* の特徴を述べている。

次に、ファージについて、分類、形態、生活環、感染の際に利用する受容体について概説した。また、抗菌剤としてファージを活用している例を紹介するとともに、そのメリット、デメリットについて述べた。さらに、本論文の目的として、新たなファージを単離し、農業や畜産業での生物防除剤としての可能性を検討したことを述べている。

第１章「ファージの単離とゲノム配列」では、大腸菌およびサルモネラ菌の両方を溶菌するファージ KIT01、KIT02、KIT03 の単離に成功し、電子顕微鏡を用いた形態観察の結果、KIT01 と KIT03 は *Myoviridae* 科、KIT02 は *Siphorivirae* 科のファージであることを明らかにした。ファージの宿主特異性は極めて厳密であることから、異なる属に分類される大腸菌とサルモネラ菌の両方に感染するこれら３種は非常にユニークなファージである。また、*Ralstonia solanacearum* を溶菌するファージ RS138 は *Siphorivirae* 科に属することも明らかにした。

KIT01～KIT03、RS138 はいずれも dsDNA をゲノムに持ち、配列解析の結果に基づき KIT03

および RS138 についてゲノムサイズ、GC 含量、ORF 数を明らかにした。また、KIT03 は溶菌酵素やホリンなど溶菌に関わるタンパク質をコードする遺伝子を持つが、インテグラーゼや毒素タンパク質をコードする遺伝子を持たないことを見出した。これは、インテグラーゼ遺伝子を持たないことは、宿主菌に自身の遺伝子を挿入する溶原性を持たないことを示唆しており、KIT03 を生物防除材として活用する上で重要な特性である。

第２章「Escherichia ファージ KIT01、KIT02、KIT03 の宿主範囲、ゲノム比較および分類」では、KIT01、KIT02、KIT03 が大腸菌とサルモネラ菌の両方に感染することから、生物防除剤として有用である可能性に着目し、まず宿主範囲を解析した。３種類のファージは、いずれも単離の際に宿主菌として用いた大腸菌 C 系統に対して溶菌活性を示すが、宿主範囲は異なっていることを明らかにした。これは、生物防除剤として３種のファージをカクテルで用いる場合の有用性を示している。

また、KIT03 について、ゲノム配列情報から ORF 解析、アノテーション、相同性解析を行った結果、KIT03 は *Myoviridae* 科 *Tequatrovirus* 属に属し、USA で単離された AR1 ファージのゲノムと 92.9%一致するゲノムを持つことが明らかとなった。また、KIT03 の long fiber gene である gp37 および gp38 は T4 ファージのものとは相同性が低いが、大腸菌 O157:H7 を溶菌するファージやサルモネラ特異的ファージのそれらと相同性が認められることを指摘し、KIT03 の広い宿主範囲との関係を議論した。

第３章「Escherichia ファージ KIT01、KIT02、KIT03 の抗菌特性の評価」では、KIT01、KIT02、KIT03 について、大腸菌およびサルモネラ菌に感染する際の増殖パラメーター（burst size、latent time）を解析するとともに、ファージに対する耐性菌の発生を解析した。KIT01 は感染後約４時間、KIT02 の場合は感染後約 6 時間までは濃度依存的に大腸菌の増殖を抑制したが、いずれもその後菌が再び増殖し始めた。これは、耐性菌が発生したことを示している。次に、KIT01 および KIT02 を同じ濃度で混合して大腸菌に感染させた場合、感染後 14 時間程度まで大腸菌の増殖を抑制した。これは、２種類のファージをカクテルで使用することによって、耐性菌の発生を抑制できたことを示している。

続いて、KIT01、KIT02、KIT03 の感染受容体を明らかにするため、大腸菌の細胞壁の外膜に存在するリポ多糖に着目した。リポ多糖合成に関わる糖転移酵素、修飾酵素の遺伝子を欠失させた各種変異大腸菌に対する感染力を解析した結果、リポ多糖は KIT01 および KIT03 の感染受容体として必須であることを見出し、その最小受容体構造を明らかにした。一方、KIT02 はリポ多糖変異株に対しても感染力を維持していたことから、リポ多糖は KIT02 の感染受容体としては必須でないことが示された。

以上より、3 種の溶菌性ファージの特性を解析し、KIT01 と KIT02 のように異なる科に属し、感染機構の異なるファージのカクテルが耐性菌発生の抑制に効果的であると結論した。

論文審査の結果の要旨

抗生物質耐性菌の発生が大きな問題となっており、新たな抗菌物質の開発は喫緊の課題である。環境中に普遍的に存在するバクテリオファージ（ファージ）は、バクテリアに特異的に感染し、溶菌するが、その宿主特異性は厳密である。そのため、ファージは抗生物質の代替となる生物防

除剤として注目されている。

本申請論文では、生物防除剤として利用可能なファージを単離し、ゲノムや特性を解析した研究成果をまとめている。申請者は大腸菌およびサルモネラ菌に着目し、土壌からこれらを溶菌するファージの探索を行い、3 種のファージ KIT01、KIT02、KIT03 の単離に成功した。いずれも属の異なる大腸菌とサルモネラ菌の両方を溶菌することができる極めてユニークなファージの発見である。これら 3 つのファージに加え、ナス科植物に感染する青枯れ病細菌を溶菌するファージ RS138 について、電子顕微鏡を用いて形態を解析し、KIT01、KIT03 は *Myoviridae* 科、KIT02 および RS138 は *Siphorivirae* 科のファージであることを明らかにした。さらに、これらファージの全ゲノム配列を解析し、いずれも溶菌酵素やホリンといった溶菌活性に必要な遺伝子を持つのに対し、インテグラーゼや毒素タンパク質をコードする遺伝子を保有していないことを明らかにした。これらのファージは溶原性を持たないことを示唆しており、これらファージの生物防除剤としての有用性が期待できる。

ファージ製剤のデメリットの一つに、ファージに対する耐性菌の発生が挙げられる。申請者は各ファージの増殖パラメーターとともに、耐性菌の発生を解析した。大腸菌に対して、KIT01 は感染後約 4 時間、KIT02 の場合は感染後約 6 時間まで濃度依存的に増殖を抑制したが、その後いずれも耐性菌の出現により菌が増殖し始めた。しかし、KIT01 および KIT02 を混合したカクテルの場合は、感染後 14 時間程度まで大腸菌の増殖を抑制することができることを明らかにした。KIT01 および KIT03 は大腸菌細胞壁外膜に存在するリポ多糖を感染受容体として利用していることを見出し、さらにその最小受容体構造を明らかにした。一方、KIT02 の場合は、感染受容体をしてリポ多糖は必須ではないことを明らかにした。これらのことより、KIT01 と KIT02 といった異なる受容体を認識するファージのカクテルが耐性菌発生の抑制に効果的であることを明らかにした。

申請者は、属の異なる大腸菌とサルモネラ菌の両方を溶菌することができる極めてユニークなファージを発見した。本研究は、ファージの基本的な特性解析に加え、異なる感染機構のファージを用いたカクテルの有用性を示した一連の学術的意義、社会的意義の高い研究である。

本論文の内容は、申請者が筆頭著者のものを含む、査読制度のある国際科学雑誌に掲載済みの下記の論文 2 編を基礎としている。

1) Bich Van Truong Thi, Nguyen Huan Pham Khanh, Ryuta Namikawa, Kaito Miki, Akihiro Kondo, Phuong Thao Dang Thi, Kaeko Kamei. Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* phage ϕRS138 of the family *Siphoviridae*. Archives of Virology (2016) 161:483–486 DOI 10.1007/s00705-015-2654-1

2) Nguyen Huan Pham-Khanh, Hirofumi Sunahara, Hanako Yamadeya, Miho Sakai, Tetsuya Nakayama, Hiromi Yamamoto, Van Truong Thi Bich, Kazuhiko Miyanaga, Kaeko Kamei. Isolation, Characterisation and Complete Genome Sequence of a *Tequatrovirus* Phage, Escherichia phage KIT03, Which Simultaneously Infects *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. Current Microbiology (2019) 76:1130–1137.
DOI https://doi.org/10.1007/s00284-019-01738-0